

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

WO9612957

Publication Title:

BIO-RECOGNITION-CONTROLLED, ION-FLOW MODULATING BIO-SENSOR

Abstract:

The proposal is for a novel, highly sensitive sensor principle, the bio-recognition-controlled, ion-flow modulating bio-sensor with the theoretical sensitivity of a single analyte molecule which makes use of the bond of effector molecules, in which effector molecules are any which bond to a ligand from the group consisting of hormones, peptides, enzyme inhibitors, environmental toxins, active pharmaceutical agents, thioles or chelate formers for the on/off control of an ion channel in a membrane.

Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/543, C12Q 1/00, G01N 27/327		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/12957
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Mai 1996 (02.05.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT95/00197		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 1995 (11.10.95)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: A 1970/94 19. Oktober 1994 (19.10.94) AT			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: PITTNER, Fritz [AT/AT]; Khekgasse 40-42/11, A-1230 Wien (AT). SCHALKHAM- MER, Thomas [AT/AT]; A-3072 Kasten 105 (AT).			
(74) Anwalt: HAFFNER, Thomas, M.; Schottengasse 3a, A-1014 Wien (AT).			
(54) Title: BIO-RECOGNITION-CONTROLLED, ION-FLOW MODULATING BIO-SENSOR			
(54) Bezeichnung: BIOREKOGNITIONS-GESTEUERTER, IONENFLUSS MODULIERENDER BIOSENSOR			
(57) Abstract			
<p>The proposal is for a novel, highly sensitive sensor principle, the bio-recognition-controlled, ion-flow modulating bio-sensor with the theoretical sensitivity of a single analyte molecule which makes use of the bond of effector molecules, in which effector molecules are any which bond to a ligand from the group consisting of hormones, peptides, enzyme inhibitors, environmental toxins, active pharmaceutical agents, thioles or chelate formers for the on/off control of an ion channel in a membrane.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Ein neuartiges hochsensitives Sensorprinzip, der Biorekognitions-gesteuerte, Ionenfluß-modulierende Biosensor mit der theoretischen Empfindlichkeit eines einzigen Analytmoleküls, welche die Bindung von Effektormolekülen, wobei Effektormoleküle beliebige Moleküle sind, welche an einen Liganden aus der Gruppe von Hormonen, Peptiden, Enzyminhibitoren, Umwelttoxinen, Pharmawirkstoffen, Thiolen oder Chelatbildnern binden, an einem Liganden zur ein/aus Steuerung eines Ionenkanals in einer Membran nutzt, wird vorgeschlagen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SJ	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

Biorekognitions-gesteuerter, Ionenfluß modulierender Biosensor

Die Erfindung bezieht sich auf eine Biosensorkonstruktion durch On-Off Steuerung eines Ionenkanals über biorekognitive Wechselwirkungen

Als Nachweissysteme für biologische Moleküle sind Enzymsensoren bekannt, die die katalytische Wirkung von Biomolekülen verwenden, um ein spezifisches Biosignal z.B. die Konzentration von Glukose in ein unspezifisches chemisches Signal z.B. Konzentration von Wasserstoffperoxid umzuwandeln, welches sodann elektrochemisch in eine elektrische Größe (einen Strom oder ein Potential) umgewandelt wird. Es ist bekannt, daß diese Sensortypen eine geringe Sensitivität und grundlegende Probleme durch die unspezifische Elektrochemie an Sensoroberflächen, welche neben Wasserstoffperoxid viele andere biologische Komponenten oxidieren kann, aufweisen.

Als Nachweissysteme für biologische Moleküle sind weiters optische Systeme wie Surface Plasmon Resonance - Sensoren bekannt, welche die Oberflächenbindung von Biomolekülen in ein optisches Signal umzuwandeln vermögen. Es ist jedoch weiters bekannt, daß der große apparative Aufwand und die zwar im Vergleich zu den Enzymsensoren bessere aber für viele Anwendungen trotzdem nicht ausreichende Empfindlichkeit dieser Sensoren diese Technik nur für manche Bereiche einsetzbar macht.

Die Erfindung zielt darauf ab durch einen neuartigen Sensoraufbau diese grundlegenden Einschränkungen zu beseitigen. (siehe Fig. 1) Die Biokomponente soll in diesem Sensoraufbau nicht zur katalytischen Umsetzung des Analyten Verwendung finden, sondern als selektive Barriere zur umgebenden Lösung. Die Analyt dient sodann als Schlüssel zur On/Off Steuerung eines Ionenkanals. Durch diesen Ionenkanal können pro Sekunde und Kanal bis zu 10^7 Ionen in einen schmalen Membran - Elektrodenspalt (10 - 300 nm) fließen und dort direkt elektrochemisch (etwa 3 pA je offener Kanal) bestimmt werden. Eine Stö-

- 2 -

rung des Meßsignals durch andere Komponenten der Lösung wird durch eine selektive Membran mit eingebauten Kanalproteinen unterdrückt.

- 5 Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von WO 89/01159 durch die mit "Molecular Modelling" mögliche sub-Nanometer genaue Anordnung eines Liganden am Kanaleingang des Ionenkanals WO 89/01159 beschreibt hingegen die Bindung von relative großen Rezeptormolekülen (Antikörper, Enzyme, Lektine,...) am
- 10 Kanaleingang. Versuche zeigen jedoch, daß eine genaue Positionierung der Bindungsstelle des Rezeptormoleküls am Kanaleingang technisch kaum möglich ist und daher eine Veränderung des Ionenstroms durch den Ionenkanal nur indirekt erfolgt, wobei der Effekt relativ gering ist. Die vorliegende Erfindung hingegen
- 15 nutzt die hochgenaue Positionierung eines kleinen Liganden am Eingang des Kanals der sodann von einem großen Molekül (Analyt) erkannt und an der optimalen Stelle (Kanaleingang) gebunden wird. Diese Vorgangsweise ist nicht nur deutlich genauer sondern auch eine Umkehrung der Vorgangsweise von
- 20 WO 89/01159 in dem das Rezeptorprotein, am Kanal immobilisiert, den Analyten biorekognitiv bindet, im vorliegenden Biosensor jedoch ein kleiner Ligand am Ionenkanal vom Analyten erkannt und gebunden wird.
- 25 Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von US 5,234,566 durch die Verwendung einzelner Membranen, nicht einer Vielzahl zwangsweise identer Membranen. Auch ist der Aufbau der Membran nicht nur durch "self assembling" möglich sondern kann auch durch andere Techniken erfolgen (z.B. LB-Filme). Eine Abhängigkeit der Leitfähigkeit vom Membranpotential ist nicht erwünscht, ein optimales Verhalten des Kanals sollte nahezu dem Ohmschen Gesetz folgen.
- 30

- Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von EP 0 441 120
- 35 A2 durch die nicht notwendige Vernetzung der Lipidmembran mit der Elektrodenoberfläche durch überbrückende Moleküle. Der dauernde Kontakt mit zwei wäßrigen Phasen ober- und unterhalb

- 3 -

der Membran (Zeichen einer nicht stabilen Membran), ist kein notwendiger Teil der vorliegenden Erfindung. Die Verwendung einer Rahmenstruktur über die sich die Lipidmembran weitererstreckt vermeidet apolaren Wände, an die die Lipidmembran grenzt, welche instabile und daher undichte Stellen der Membran darstellen würden.

Die vorliegende Erfindung beinhaltet nicht die in WO 94/07593 geforderte direkte Vernetzung der Lipidmembran mit der Elektrodenoberfläche unter Verwendung überbrückender Linkerlipide. Ebenfalls unterscheidet sich die vorliegende Erfindung von EP 0 394 997 A1 dadurch, daß der Inhalt der Erfindung den Aufbau eines Biosensors unter Verwendung der Bindung eines Moleküls an einen immobilisierten Liganden zur ein/aus Steuerung eines Ionenkanals in einer Membran nutzt und nicht den direkten Effekt organischer Moleküle auf den Kanal selbst. Weiters ist die multimere Struktur der Porine mit dem Anspruch 1 (stabiles Molekül) nicht vereinbar. Das neuartige Sensorprinzip beruht auf folgenden Erkenntnissen:

Als Ionenkanal kann das sehr gut untersuchte und leicht zugängliche Kanalpeptid Gramicidin als Basis eines neuen Affinitätssensors dienen. Sowohl die Sequenzen als auch genaue Moleküldaten unterschiedlicher Gramicidinderivate konnten in den letzten Jahren bestimmt werden. Die Sequenzhomologien sind durchwegs hoch. Die Ionenkanäle werden dabei durch 2 assoziierte Moleküle Gramicidin gebildet. Die Raumstruktur des Peptids ist dabei eine 6.3 - Helix die zentral einen offenen Ionenkanal bildet und mit Tryptophanresten an den beiden Membranseiten dynamisch verankert ist.

Es konnte durch patch clamp Techniken gezeigt werden, daß an beiden Seiten der Membran Gramicidin - Monomere eingeschränkt frei floaten. Kommt es zu einer Assoziation von 2 Molekülen Gramicidin unterschiedlicher Membranseiten so bildet sich ein durchgängiger Ionenkanal. (siehe Fig. 1)

- 4 -

Chemische Modifikationen der Gramacidinpeptide am N - Terminus können nach Deformylierung (= Abspaltung der Cappingstruktur des Peptids) 2 Moleküle Gramacidin zu einem kovalenten Dimer (z.B. mit Weinsäure oder Malonsäure als Bisamide) verknüpfen.

5 (siehe Abbildung) Diese Gramacidin-Dimer bilden die im Sinne der Patentanmeldung notwendigen stabilen Ionenkanäle in natürlichen und artifiziellen Membranen. Untersuchungen des Ionenkanals zeigten eine Inhibierbarkeit des Ionenstroms durch eine starke Bindung von divalenten Kationen. Öffnet oder

10 schließt sich ein einzelner Ionenkanal in der Membran so kann dies direkt durch einen Ionenstrom von 10^7 Ionen/s durch die Membrankanäle gemessen werden. Bisgramacidinmoleküle als Ionenkanäle im Sinne der Patentanmeldung sind durch ihre hohe Stabilität, die gut chemische Charakterisierung, die Möglich-

15 keit einer Vielzahl chemischer Modifikationen und insbesondere durch die hohe Leitfähigkeit der Kanäle besonders gut geeignet.

Die zweite essentielle Komponente des neuen Sensorkonzepts ist

20 die Membrantechnologie. Es wird dabei der Vorteil der black lipid membranes d.h. der freie Zugang zu beiden Membranseiten mit dem Vorteil der self assembling membranes d.h. der stabilen Anordnung eines selbst aufbauenden Lipidfilms kombiniert. Die Wahl eines Photogelpolymers als Trägermatrix für den Lipidfilm

25 und die kovalente Kopplung der Lipidmonomere an diese Geloberfläche stabilisiert den Lipidfilm gegen jede mechanische Zerstörung, bzw. gegen das Fließen des zweiten Lipidfilms der Doppelmembran.

30 Die dritte Neuerung im Rahmen des Sensorkonzepts soll die Verwendung von dünnschichttechnologischen Verfahrensschritten im Rahmen des Sensoraufbaus sein. Dabei soll zuerst der elektrochemische Sensor nach etablierten dünnschichttechnologischen Verfahren gefertigt werden. Sodann soll mit Photolacken z.B.

35 aus der AZ-Serie oder mit Prohimid-Lack die Rahmenstruktur des Lipidfilms aufgebaut werden. Der nächste Schritt ist sodann

die Füllung der hydrophoben Rahmenstruktur mit einem hydrophilen Gel Photopolymer als Trägersystem für die Lipidmembran.

5 Die Kopplung des On/Off Schalters auf den Gramacidin Kanal erfolgt sodann durch selektive chemische Modifikation der carboxyterminalen - Ethanolamin Cappingstruktur. Dabei soll ein kleines durch Biorekognition erkanntes Molekül durch die Bindung eines großen Moleküls den Ionenkanal reversibel verschließen. (siehe Fig. 1)

10 Die Erfindung zielt somit darauf ab eine neuartige hochsensitives Sensorprinzip mit der theoretischen Empfindlichkeit eines einzigen Analytmoleküls zu schaffen. Die Empfindlichkeit wird nur durch die Bindungskonstante Ligand/Bindungsmolekül
15 und durch den Zeitbedarf des statistischen Aufeinandertreffens der beiden Moleküle begrenzt.

Weiters zielt die Erfindung auf den Aufbau solcher Sensoren mit Dünnschichttechnologie-kompatiblen Methoden wie Dünnschichtsubstraten, Sputtern und Aufdampfen der Metallelektroden, Einsatz von Photolacken und mit photosensitiven Polymeren
20 hergestellten dünnschichttechnologischen Lipidmembranträgern ab und beinhaltet darüber hinaus auch den neuartigen Aufbau von kovalent gebunden Lipidmembranen an Polymer-Flüssigkeits-
25 Grenzflächen.

Die moderne medizinisch-biochemische Analytik stellt immer größere Anforderungen an die Selektivität und Spezifität von Meßsystemen.

30 Schnellere und insbesondere einfachere Testverfahren in der Diagnostik ermöglichen vielfach erst die routinemäßige Bestimmung wichtiger körpereigener und körperfremder Substanzen in der Arztpraxis oder zumindest abseits etablierter Universitätskrankenanstalten. Darüber hinaus kann auch die direkte
35 Messung von Blut- oder Urininhaltstoffen durch den Patienten neuartige Möglichkeiten eröffnen.

Der Einsatz des neuen Sensortyps ermöglicht die Nutzung aller biochemischen und chemischen Affinitätsreaktionen zwischen kleinen diagnostisch oder umweltanalytisch relevanten Ligan-
denmolekülen und einem großen den Ionenkanal sperrenden Mole-
kül.

Der Einsatz der Erfindung kann daher z.B. als Blut HIV-Anti-
körper Sensor zur HIV-Diagnostik und zur Verlaufskontrolle von
HIV-Infektionen erfolgen. Die derzeit im Handel befindlichen
HIV-Tests sind trotz hoher Standards im diagnostischen Fenster
von etwa 3 - 6 Wochen zu unsensitiv und damit in vielen Fällen
zu unsicher. Dies führt einerseits zu quälender Unsicherheit
für Betroffene bei unklaren Testergebnissen führen anderer-
seits können dadurch in Blutbanken immer noch trotz sorgfälti-
ger Überprüfungen positive Seren in den Verkehr gelangen.

Insbesondere in Ländern der dritten Welt sind die bestehenden
Einmaltests zu teuer aber auch in vielen Fällen zu kompliziert
in der Handhabung.

Es kann daher ein selektives Peptid aus dem V3 - loop des gp41
Proteins als Erkennungsdeterminante an den Kanaleingang des
Gramicidins gebunden werden.

Die Sequenz LGLWGCSGKLIC (eine Teilsequenz des HIV-Proteins
gp41) bindet nun ihrerseits an Serumantikörper von nahezu
100 % aller HIV-infizierten Personen. Zusätzlich muß die
Sequenz LGMWGCSGKLIC für HIV-infizierte aus Westafrika verwen-
det werden. Eine bindende Sequenz für HIV-2 lautet
LNSWGCAFRQVC. Dabei bilden jeweils die beiden Cysteine sowohl
bei HIV 1 als auch HIV 2 eine Disulfidbrücke die für die volle
Antigenität des Peptids essentiell ist. In der Mitte der
dadurch gebildeten sogenannten V3 - loop ist eine basische
Aminosäure essentiell. Für manche seltene Seren können auch
noch flankierende Sequenzen von etwa 5 Aminosäure die Anti-
genität verbessern.

Die Bindung des Serumantikörpers führt im Rahmen der Erfindung zu einer Kanalblockade. Dieser Effekt kann dann mit hoher Sensitivität und auch Selektivität gemessen werden. Nach einem
5 Test wird der Sensor kurz mit einem Chaotrop gewaschen und der gebundene Antikörper entfernt. Sodann kann der Sensor für den nächsten Test verwendet werden.

Der Einsatz der Erfindung kann weiters auch als Harn Östrogen-
10 sensor zur Bestimmung der fruchtbaren Tage erfolgen. Die Erkennung der fruchtbaren Tage im Rahmen des weiblichen Zyklus ist durch die 24-48 Stunden vorangehende deutliche Harn-Östrogenspitze mit guter Genauigkeit möglich. ELISA- Tests zur Bestimmung dieses Harn-Parameters (oder von LH) sind seit
15 einiger Zeit im Handel. Jedoch sind diese Tests nur Einmaltest und überaus teuer, so daß eine Dauermessung durch den Patienten nicht möglich ist. Das neue Sensorprinzip kann einen Sensorkopf ermöglichen der zumindest eine Zyklusdauer d.h. etwa 28 Tage verwendet werden kann und deutlich genauere Aus-
20 sagen über den Zykluszustand ermöglicht. Dieses Testsystem kann sowohl bei unerfülltem Kinderwunsch die genaue Messung der empfängnisbereiten Tagen ermöglichen als auch als eine äußerst schonende Methode zur Empfängnisregelung verwendet werden. Die Überwachung der Wirkung von Antiöstrogenen im Rah-
25 men der Tumorthherapie stellt einen weiteren wichtigen Einsatzbereich des Sensors dar. Auch im Verlauf einer Schwangerschaft ist die Messung des Östrogenspiegels von diagnostischer Bedeutung.

30 Der Sensor kann über spezifische Antikörperbindung Östrogen und dessen 17-Glucuronido- und Sulfokonjugate erkennen. Die Menge der Harnöstrogene kann sodann als Zeitintegration über offene und geschlossene Zeiten an einem Kanal, oder auch als Mittelwertsstrom (bzw. dessen Zeitabhängigkeit) an einigen
35 bis 100 Ionenkanälen bestimmt werden. Als großer Unterschied zu den vorangegangenen HIV Sensortyp soll hier jedoch in reversibler Weise die Bindung an den Kanal in einem Verdrän-

- 8 -

gungsassay genutzt werden (siehe Abbildung 1). Als zusätzlich Komponente wird hier der Sensor mit einer analytpermeablen aber antikörperimpermeablen Membran überzogen. Im Intermembranraum befinden sich Antikörper die selektiv mit Östrogen und seinen Harnderivaten reagieren und um einen gleichartigen Liganden am Ionenkanaleingang kompetitieren. So wird durch eine steigende Menge Harnöstrogen der Ionenfluß durch die Membran von beinahe Null auf einen dem Östrogenspiegel proportionalen Wert erhöht.

10

Als äußere Membran kann dabei ein kommerziell erhältlicher Typ einer Dialysemembran verwendet werden.

In einfacher Weise kann dieser Sensor sodann leicht verändert auch z.B. zur Messung des Hormons Progesteron verwendet werden.

Die Erfindung zielt darauf ab einen Sensor mit etwa folgenden Arbeitsschritten aufzubauen:

20

- 1.) Chemische Synthese eines Ionenkanals z.B. Bisgramicidin A und kovalente Kopplung der Liganden an den Kanaleingang
- 2.) Dünnschichttechnologischer Sensoraufbau
- 3.) Polymermembranaufbau des Sensors
- 25 4.) Lipidcoating des Sensors,
- 5.) Einbau des ligandenmodifizierten Ionenkanals
- 6.) Einbau in ein Kunststoffgehäuse
- 7.) Für reversible Messungen Aufbringen des reversiblen Bindungsmoleküls und Einbau einer semipermeablen Membran
- 30 8.) Messung mit dem Ionenkanalsensor

Die chemische Synthese eines Ionenkanals kann am Beispiel des Ionenkanalpeptids Gramicidin erläutert werden. Die Synthese des Kanalpeptids Gramicidin A und dessen kovalenten Dimeren des Bisgramicidins geht von Gramicidin D aus. Mit Hilfe von silica oder reversed phase Chromatographie kann sodann reines Gramicidin A gewonnen werden. Dieses kann mit wasserfreier

35

- 9 -

Salzsäure in einem organischen Lösungsmittel z.B. Methanol deformatiert werden. Das Produkt wird sodann wiederum mit reversed phase Chromatographie gereinigt. Die Dimerisierung erfolgt dann durch Kopplung mit einem Malonsäureester, Weinsäureester oder strukturell verwandten Crosslinkern. Dabei wird der Diethylester der Dicarbonsäure und Gramacidin A in DMF gelöst und langsam DPPA (Diphenylphosphorylazid) zugegeben. Nach der Reaktion wird das Produkt wiederum mit reversed phase Chromatographie gereinigt.

10

Die Kopplung der Affinitätsliganden an das carboxyterminale Ethanolamin (des Gramacidin A) erfolgt durch Aktivierung der beiden freien terminalen OH-Gruppen des Moleküls mit z.B. Divinylsulfon oder Chlorameisensäure-nitrophenylester. Sodann kann der Ligand durch seine OH, NH₂, oder SH Gruppe selektiv terminal gebunden werden.

Es können auch beide terminalen OH-Gruppen des Bisgramacidins mit Vinylsulfon oder Chlorameisensäure-nitrophenylester aktiviert und mit einem Diamin (Ethylendiamin) oder einer Dimercaptoverbindung umgesetzt werden. Das sich durch die Umsetzung bildenden Bisgramacidinderivat trägt sodann zwei terminale reaktive Amino (oder SH)-Gruppen. Sodann kann mit Iodactamido-capronsäure-N-hydroxysuccinimid-estern die zur Kopplung von Histidinen nötige alkylierende Gruppe in das Molekül eingeführt werden.

Die Kopplung von Östrogenen erfolgt an der Position 6 (Östriol, Östron) oder an Position 17 (Östradiol) der konjugierten Ringsysteme. Als Liganden für Östradiol dienen dabei 17 β -Östradiol 17-hemisuccinat, 17 β -Östradiol 3-glycidylether oder 17 β -Östradiol 6-(O-carboxymethyl)oxim. 17 β -Östradiol 17-hemisuccinat und 17 β -Östradiol 6-(O-carboxymethyl)oxim sollen an das bereits beschriebene bisaminomodifizierten Bisgramacidin über eine Amidbindung kovalent verknüpft werden. 17 β -Östradiol 3-glycidylether kopplet direkt an das bereits beschriebene bisaminomodifizierten Bisgramacidin.

Zur Kopplung des HIV-Peptid kann einerseits nach Schutz der Aminogruppe des Lysins (Arginins) im V3-loop die N-terminale Aminogruppe zur Kopplung verwendet werden. Als zweite Strategie können einige zusätzliche terminale Histidine in das Peptid eingeführt werden. Diese können dann über alkylierende Crosslinker an den Carboxyterminus des Gramacidins gebunden werden.

- 10 Die Fertigung der Biosensorsubstrate erfolgt durch dünn-schichttechnologische Verfahren. Die Fertigung folgt dabei dem Schema siehe Beispiele.

- 15 Die nach den genannten Verfahren hergestellten beschichteten Sensorsubstrate werden sodann durch Polymer- dünn-schichttechnologische Verfahren für den Einsatz in elektrochemischen Ionenkanal-Biosensoren modifiziert.

- 20 Der Träger der Lipidbiomembran baut sich aus zwei unterschiedlichen photostrukturierbaren Polymeren auf: Einer Rahmenstruktur aus hydrophobem d.h. lipophilem Photolack und einem hydrophiles Photopolymer innerhalb der Rahmenstruktur als Membrantträger.

- 25 Die Rahmenstruktur aus hydrophobem d.h. lipophilem Photolack kann durch photostrukturierbaren Polymere aus der Halbleiterindustrie aufgebaut werden. Es eignen sich dafür einerseits etablierte Photolack vom Typ AZ (Hoechst) die durch nachfolgendes Einbacken bei Temperaturen über 150 Grad völlig vernetzten und daher völlig unlöslich werden. Ein photostrukturierbarer Polyimidlack (z.B. Probimide 408) weist ebenfalls eine außergewöhnlich gute chemische Resistenz auf muß jedoch bei Temperaturen zwischen 350 und 400 Grad eingebrannt werden. Ausgehend von den in den letzten Jahren entwickelten hydrophoben photostrukturierbaren Polymeren aus der Halbleiterindustrie können analog auch hydrophile Polymersysteme aufgebaut werden. Dabei können biokompatible, hydrophile und quellfähige

- 11 -

Polymervorstufen durch bivalente Photovernetzer vernetzt werden. Es bildet sich ein Polymernetzwerk mit steuerbarer Porengröße, welches als strukturierbares Trägermaterial zur Immobilisierung der Biokomponenten d.h. Lipidmembranen und Ionenkanäle dient.

Insbesondere Polyvinylpyrrolidinpolymere mit hydrophilen Seitengruppen (-OH, Ester amide, ..) können als viskose Lösungen durch Spinnprozesse auf die Sensorrohlinge aufgebracht werden und durch Photocrosslinker (meist Carben und Nitren - Bildner z.B. 4,4'-Biazidostilben-2,2'-disulfonsäure) mit langwelligem UV (350 - 390 nm) zu Polymerfilmen vernetzt werden. Die reaktiven funktionellen Gruppen des Polymers können dann aktiviert und zur Kopplung von Proteinen, Peptiden und Lipiden verwendet werden.

Da Lipidfilme sowohl untereinander als auch an der Zellwand nicht durch kovalente Wechselwirkungen gebunden sind, können sie leicht unter desintegrierenden Bedingungen extrahiert werden. Dazu eignen sich hydrophobe Agenzien, Detergentien und Alkali. Zum Aufbau einer stabilen Lipidmembran müssen zwei grundsätzliche Probleme gelöst werden: Stabile Bindung des Lipidfilms an die Unterlage und das Verhindern des Abfloatens des oberen Lipidfilms im Lipiddoppellayer.

Die stabile Bindung des unteren Lipidfilms an die Geloberfläche erfolgt durch hydrophobe, ionische oder kovalente Kopplung von z.B. Thiolipiden an eine chemisch reaktive Oberfläche

Dabei wird vor der Aufbringung des z.B. self assembling oder LB Thio-Lipidfilms auf die Oberfläche dieselbe in folgender Weise modifiziert: Einführung reaktiver OH-Gruppen (z.B. durch Sauerstoffplasma) und Kopplung der OH-Gruppen mit bivalenten OH und SH reaktiven Crosslinkern wie z.B. Divinylsulfon.

- 12 -

Sodann wird der in der genannten Weise aktivierte Sensor in ein Bad mit in organischem LM gelösten Thio-Lipiden getaucht, es erfolgt das self assembling.

- 5 Der zweite Lipidfilm kann am ersten kovalent gebunden Lipidfilm durch den Einbau von symmetrischen Bis-Lipiden verankert werden. Diese tragen ebenfalls mindestens eine Thiogruppe um an der Gelmatrix fixiert zu sein. Ein Anteil an frei beweglichen Lipiden ermöglicht die fluide Struktur der Lipidmembran.
- 10

Der Einbau des modifizierten Gramacidinkanals erfolgt im gleichen Arbeitsschritt mit dem self assembling des Lipidfilms. Das Liganden - modifizierte Bisgramicidin besitzt noch

15 eine freie reaktive Gruppe am zweiten Carboxyterminus des Bisgramicidinmoleküls. Diese kann in analoger Weise wie die Lipide kovalent mit der Geloberfläche koppeln und so den Kanal fix (d.h. kovalent) in der Membran verankern.

- 20 Durch Wechselstrom-Leitfähigkeit, Phasenwinkel und Impedanz kann die Ausbildung von Inhomogenitäten und die Dichtheit der Lipidmembranschichten auf Metalloberflächen direkt beobachtet und quantifiziert werden. Insbesondere die Bildung self assembling von Filmen äußert sich direkt in einer Änderung der
- 25 Sensorkapazität.

Elektrochemische Leitfähigkeit- und Strommessungen ähnlich der Patch clamp Messung an Ionenkanälen in intakten Zellen oder an Membranfragmenten in der Spitze von Glaspipetten durch "mega seal" gebunden sind das fundamentale Meßprinzip des Ionenkanalbiosensors.

30

Die in der genannten Weise aufgebauten Sensoren liefern als Mikroleitfähigkeitsbiosensoren ein dem Ionenfluß proportionales Stromsignal.

35

- 13 -

Als Meßplätze sind z.B. mit OPA 128 (Burr Brown) Eingangsstufen ausgestattet Verstärker geeignet. Auch alle Meßplätze für Einzelionenkanalmessungen in der patch clamp Technik im Bereich bis 0.1 pA sind für den neuartigen im Rahmen der Erfindung beschriebenen Sensoren optimal geeignet.

Die Erfindung wird nachfolgend an Hand von Ausführungsbeispielen näher erläutert

10 Beispiel 1: Aufbau der Sensorsubstrate

- Verwendung von Sensorsubstraten aus Aluminiumoxid, Glas oder Kunststoff (Polycarbonat)
- Herstellung von Photomasken über CAD, PS-File, Photoplotter, Eisenoxidmaske, bzw. Kunststofffilmmaske
- Photolack AZ5218 E, positiv 5000 rpm, 30 s
- Mask-aligner: Karl Süss Modell MA 45, 360 nm 350 W, 7.5 s oder Photolack-Entwickler AZ-Developer/Hoechst 60 s
- Einbacken 120°C, 30 min
- Hochvakuumbedampfung bzw. Sputtern der Elektroden z.B. 50 nm Titan, 100 nm Platin, oder Gold bzw. Palladium, Anlage: Balzers, ESQ 110, BB800 059BD mit 270° Elektronenstrahlumienkanone bei $2 \cdot 10^{-5}$ Torr, 150°C 1 nm/s bzw. Laboranlage der Fa. Balzers
- Floaten: 30 min, 80°C, Ultraschall mit AZ-Remover
- Isopropanol Waschschrift
- Sägen der Wafer mit 100 µm Diamantsäge mit Computersteuerung
- Aufbringen einer Ag/AgCl-Referenzelektrode durch Ag-Polymer-Lack
- und Curing bei 110°C, 30 min

Beispiel 2: Reinigung des Gramacidin A
Gramacidin D wird auf einer SI - 100 Polyol Säule der Firma Serva mit einem Gradient von 0 - 80 % Methanol/Wasser von den anderen Gramacidinen (B,C) abgetrennt.

- 14 -

Beispiel 3: Carboxyterminale Modifikation des Gramicidins

500 mg Gramicidin A werden mit 10 ml Benzol gerührt, ein 3 - 5 facher Überschuß des Carboxygruppen modifizierten Liganden zugegeben und mit 10 fachem molaren Überschuß eines Carbodiimids (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid) versetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur im Dunkeln vorgenommen. Der Verlauf der Reaktion wird mit auf Silagel-Platten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Chloroform/Methanol/Wasser: 100/10/1) verfolgt.

10

Das Reaktionsgemisch wird sodann auf einer präparativen C-18 reversed phase Säule mit Methanol/Wasser gereinigt.

Beispiel 4: Synthese des Bisgramicidins

15 Das Ausgangsprodukt ist desformyliertes Gramisidin A, welches durch Spaltung von Gramicidin A mit wasserfreier Salzsäure in Methanol und nachfolgende Reinigung mit präparativen C-18 reversed phase Säule mit Methanol/Wasser synthetisch gewonnen wird.

20

Die Dimerisierung des ist desformyliertes Gramicidin A erfolgt durch Zusatz eines 5 fachen molaren Überschußes von Diphenylphosphorylazid zu einer Lösung von einem molaren Teil desformyliertem Gramicidin A und einem Überschuß (3 - 10) fach der Dicarbonsäure (z.B. Malonsäure) in Dimethylformamid bei unter - 10 °C. Die Reaktionsdauer bei 0 °C beträgt 24 - 48 Stunden. Nach Stoppen der Reaktion mit Ethanol wird das Reaktionsgemisch nach einigen organisch/wässrigen Extraktionsschritten zur Trockene eingeengt und nach Aufnehmen des Rückstands in einer kleinen Menge Methanol auf einer präparativen C-18 reversed phase Säule mit dem Laufmittelsystem Methanol Wasser (90/10 bis 95/5) gereinigt.

30

Beispiel 5: Aufbau der hydrophoben Rahmenstruktur

35 * Der Polyimidphotolack Probimide 408 wird durch Spincoaten auf den Sensorchip aufgebracht (5000 rpm, 2 min).

* Softbake bei 110 °C für 15 Minuten

- 15 -

- * Belichtung mit Photomaske mit UV (365 nm) 10 s
 - * Postbake bei 100 °C für 5 Minuten
 - * Entwicklen mit Tauch- oder Sprayentwickler 60 s (z.B. QZ 3301)
- 5 * Curing: Linear in 1 h auf 350 °C, dann 350 °C für 30 Minuten

Beispiel 6: Aufbau des hydrophilen Lipidträgerpolymers

Das hydrophile photovernetzte Gel wird nach folgender Vorschrift aufgebaut:

- 10 2.5 % (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon MW: 360.000 oder 1.000.000) in destilliertem Wasser und 0.75 % (w/v) 4.4'-Diazidostilben-2,2'-disulfonsäure in destilliertem Wasser werden gemischt (3:2 v/v). Die Präpolymerlösung wird entweder in die Photolackrahmenstruktur pipettiert oder der Sensor wird
- 15 durch ein Eintauch- oder Spinbeschichtungsverfahren mit der Präpolymerlösung überzogen.

- Das Photopolymer wird durch Belichten mit einer 50 W Quecksilberdampf Lampe für 5 s durch Einwirken von UV-A und UV-B gehärtet und überschüssiger Vernetzer durch einen Waschschrift in
- 20 Phosphatpuffer pH = 7.0 0.1 M entfernt.

Beispiel 7: Aufbau des Biosensors

- Der Ablauf der Beschichtungsschritte und des Meßaufbaus ist in
- 25 Figur 2 zusammengefaßt.

Beispiel 8: Reinigung von Platinsensorelektroden

- Nach der Verwendung von löslichen Thio-Verbindungen sind Metalloberflächen chemisch bzw. elektrochemisch blockiert =
- 30 derivatisiert. Um die kovalent Bindung der Thiole mit der Elektrodenoberfläche zu brechen wird die Elektrode elektrochemisch zwischen -600 und +1200 mV (bis in den Bereich der Sauerstoffentwicklung) versus Ag/AgCl gereinigt. Die elektrochemische Reinigung erfolgt durch Anlegen einer zeitlich
- 35 variablen Spannung an einen in neutralen Puffer eingetauchten Sensor.

- 16 -

Beispiel 9: Lipidbeschichtung der Sensorelektroden

Die in Trifluorethanol gelösten Lipide (2-10 $\mu\text{g}/100 \text{ cm}^2$ Oberfläche) werden an einer Luft/Flüssigkeit Phasengrenze auf einem LB-Trog gespreitet. In einem automatisierten LB-System wird der Lipidfilm von einer fluiden in eine semikristalline Phase komprimiert. Der Sensor wird sodann durch den Lipidfilm gezogen wobei ein Nanoaktuator der Firma Physik-Instrumente/Deutschland (von einem DC-Motor mit der Auflösung von 60 nm angetrieben) verwendet wird.

10

Ungesättigte Lipidfilme werden mit einer Photomaske bedeckt und durch das Licht einer 50W Mitteldruck Quecksilberdampflampe etwa 120 Sekunden vernetzt. Dabei werden die Lipide sowohl innerhalb der Lipidschicht als auch mit einem reaktiven Träger vernetzt.

15

Der Einbau modifizierter Kanäle erfolgt in analoger Weise mit Mischungen aus Lipid und Kanalpeptiden.

Patentansprüche:

1. Biosensor, dadurch gekennzeichnet, daß als Meßprinzip ein Ionenstrom durch die Kanäle von in Lipidmembranen eingebauten kanalbildenden Molekülen verwendet wird, wobei durch die Bindung von Effektormolekülen, welche beliebige Moleküle darstellen die an einen Liganden aus der Gruppe von Hormonen, Peptiden, Enzyminhibitoren, Umwelttoxinen, Pharmawirkstoffen, Thiolen, Chelatbildnern und toxischen Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 2000 Dalton und Kombinationen davon binden, der Ionenstrom verringert wird, und dabei die Verringerung durch die Bindung von Effektormolekülen an am Kanal kovalent immobilisierten Ligandenmolekülen bewirkt wird, und jeder Kanal aus einem stabilen Molekül oder mehreren stark gebundenen, nicht in Untereinheiten dissozzierenden Molekülen besteht.
2. Biosensor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Meßsignal der Ionenstrom durch die Kanäle gemessen wird, wobei die Messung elektrochemisch über die Ionenkonzentrationen, als Leitfähigkeit quer durch Membran, als Kapazität der Membran oder als Konzentration fluoreszierender Ionen wie Europium im inneren Membrankompartiment erfolgen kann.
3. Biosensor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipidmembran über Metall- oder Halbleiterelektroden direkt oder mit einem Submembranvolumen von weniger als 3 cm³ angebracht ist, wobei die auf dem Sensorsubstrat aufgebrachten Elektroden durch Dünnschichttechnologie, Dickschichttechnologie oder aus dünnen gewalzten Metallfolien gefertigt sind.
4. Biosensor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipidmembran durch wasserhaltige und/oder leitfähige kovalent oder ionisch vernetzte Polymere, Biopolymere, Gele, Dendrimere oder kristalline Festkörper getragen wird.

- 18 -

5. Biosensor nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipidmembran auf den wasserhaltigen und oder leitfähigen kovalent oder ionisch vernetzten Polymeren, Biopolymeren, Gelen, Dendrimeren oder kristallinen Festkörpern kovalent
5 gebunden ist.
6. Biosensor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rahmen für die Lipidmembran durch Photostrukturieren eines Dünnsfilms von Polymeren, Gläsern, Keramiken, Kohlenstoff, Metallen oder Halbleiter erzeugt sind.
10
7. Biosensor nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanalmoleküle Peptide oder Proteine verwendet werden.
- 15 8. Biosensor nach Anspruch 1, 2 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanal ein Peptidkanal mit einer 6.3 Helix verwendet wird.
9. Biosensor nach Anspruch 1, 2, 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle Peptidkanäle aus Gramicidinen und deren kovalent verknüpften Dimeren insbesondere N- terminal verknüpften Dimeren eingesetzt werden.
20
10. Biosensor nach Anspruch 1, 2 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle kovalent vernetzte Alamethicin Kanäle verwendet werden.
25
11. Biosensor nach Anspruch 1, 2 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle Bakterientoxine verwendet werden.
30
12. Biosensor nach Anspruch 1, 2 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung des Liganden am oder nahe dem Carboxyterminus des Kanalpeptids erfolgt.
- 35 13. Biosensor nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß als Kanäle synthetische zyklische Peptide oder zyklische

- 19 -

aus Zuckereinheiten aufgebaute Moleküle wie hydrophob modifizierte Cyclodextrine verwendet werden.

14. Verwendung des Biosensors nach Anspruch 1 und 2 zur Mes-
5 sung von Hormonen, viralen Proteinen und Peptiden, bakteriellen Proteinen und Peptiden, Umweltgiften, humanen Proteinen und artifiziellen Toxinen.

Fig. 1

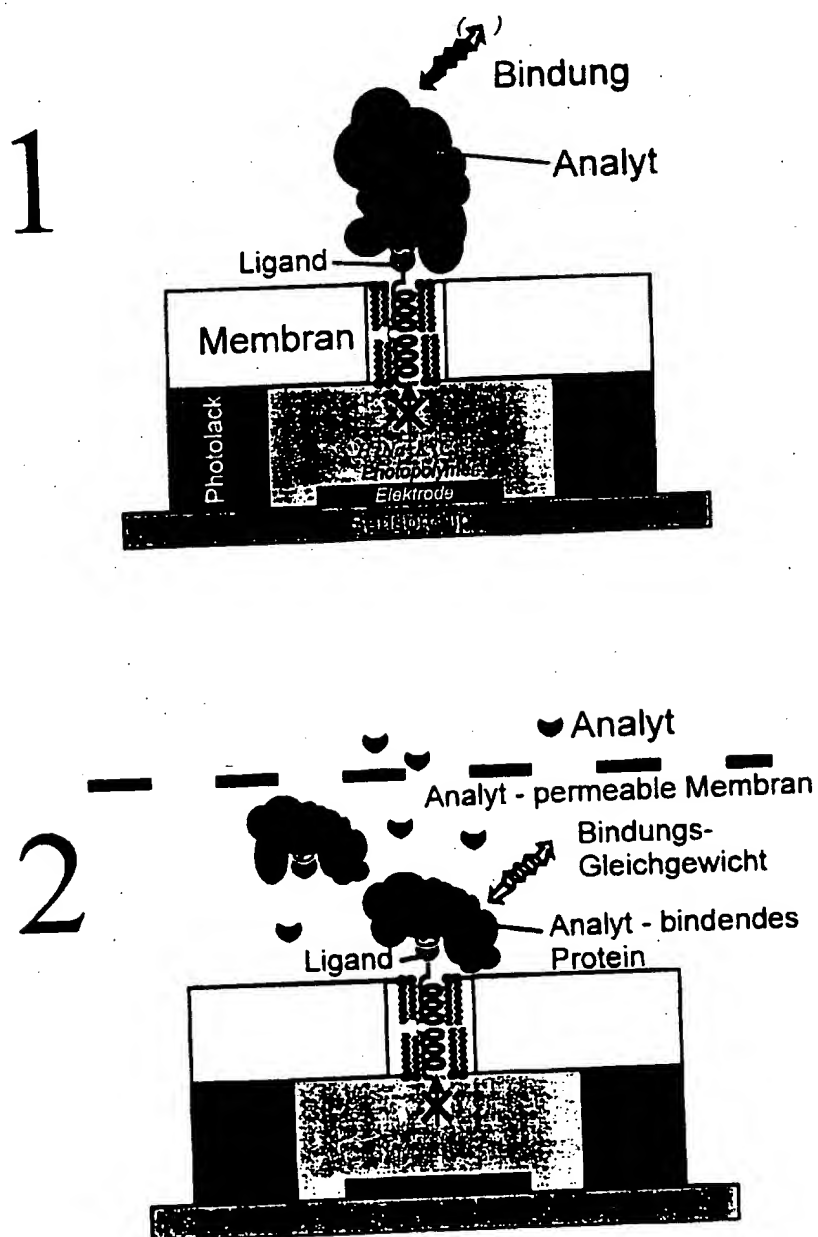
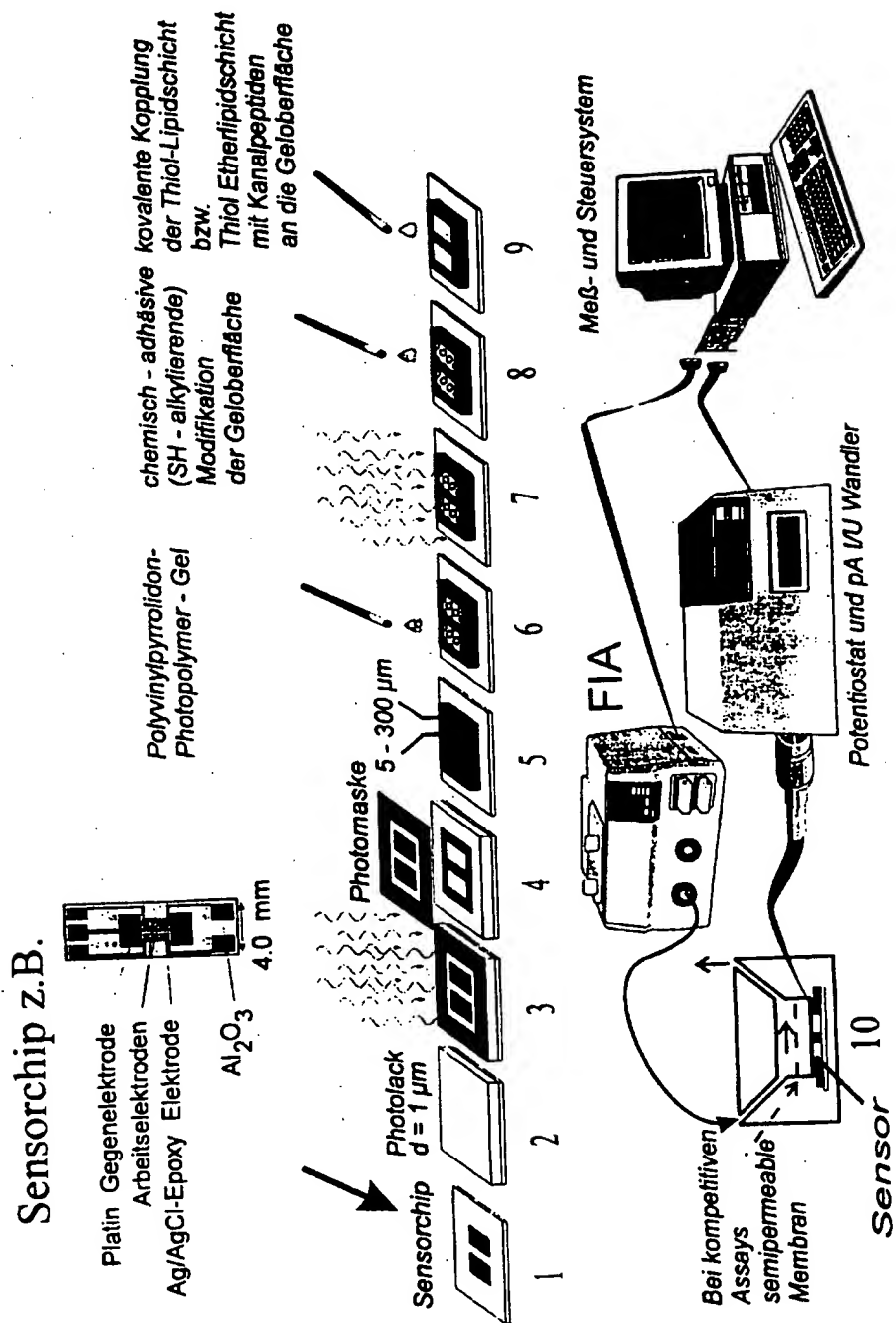


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC/AT 95/00197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/543 C12Q1/00 G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NEW FUNCTIONALITY MATERIALS, VOLUME B SYNTHESIS AND FUNCTION CONTROL OF BIOFUNCTIONALITY MATERIALS., - 1993 AMSTERDAM, NL, pages 111-116, XP 000566146 Y. UMEZAWA ET AL 'Development of biological and synthetic receptor-embedded lipid membrane assemblies with molecular recognition and signal transduction/amplification functions.' see the whole document ---	1-14
P, X	WO, A, 95 16206 (BIOSYSTEMS TECHNOLOGY CORP) 15 June 1995 see page 10, line 18 - page 12, line 16; figures --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 1996

Date of mailing of the international search report

27.03.96

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC./AT 95/00197

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 10212 (CASE GEORGE D ;WORLEY JENNINGS F III (US)) 27 May 1993 see the whole document ---	1-14
Y	WO,A,94 12875 (AUSTRALIAN MEMBRANE & BIOTECH ;UNIV SYDNEY (AU); KING LIONEL GEORG) 9 June 1994 see the whole document ---	1-14
Y	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, vol. 9, 1994 pages 343-351, XP 000566057 M. ERAY ET AL 'Highly stable bilayer lipid membranes (BLMs) formed on microfabricated polyimide apertures.' see the whole document ---	1-14
A	EP,A,0 441 120 (YEDA RES & DEV) 14 August 1991 cited in the application see the whole document ---	1
A	WO,A,89 01159 (COMMW SCIENT IND RES ORG) 9 February 1989 cited in the application see the whole document ---	1
A	WO,A,90 02327 (AUSTRALIAN MEMBRANE & BIOTECH) 8 March 1990 cited in the application see the whole document ---	1
A	EP,A,0 394 997 (EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG) 31 October 1990 cited in the application see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC./AT 95/00197

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9516206	15-06-95	NONE	
WO-A-9310212	27-05-93	US-A- 5328847	12-07-94
		AU-B- 3177193	15-06-93
		EP-A- 0643764	22-03-95
WO-A-9412875	09-06-94	AU-B- 663243	28-09-95
		AU-B- 5618894	22-06-94
		CA-A- 2150915	09-06-94
		EP-A- 0672251	20-09-95
EP-A-0441120	14-08-91	IL-A- 93020	29-06-95
		AT-T- 130938	15-12-95
		AU-B- 625017	25-06-92
		AU-B- 6924591	11-07-91
		CA-A- 2033776	10-07-91
		DE-D- 69114870	11-01-96
		JP-A- 6090736	05-04-94
		US-A- 5204239	20-04-93
WO-A-8901159	09-02-89	AT-T- 113724	15-11-94
		AU-B- 2127988	01-03-89
		CA-A- 1335879	13-06-95
		DE-D- 3852036	08-12-94
		DE-T- 3852036	09-03-95
		EP-A- 0382736	22-08-90
		JP-T- 3503209	18-07-91
		US-A- 5436170	25-07-95
WO-A-9002327	08-03-90	AU-B- 4078789	23-03-90
		CA-A- 1315338	30-03-93
		EP-A- 0432188	19-06-91
		US-A- 5234566	10-08-93
EP-A-0394997	31-10-90	DE-A- 3913815	08-11-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PC./AT. 95/00197

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/543 C12Q1/00 G01N27/327

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NEW FUNCTIONALITY MATERIALS, VOLUME B SYNTHESIS AND FUNCTION CONTROL OF BIOFUNCTIONALITY MATERIALS., - 1993 AMSTERDAM, NL, Seiten 111-116, XP 000566146 Y. UMEZAWA ET AL 'Development of biological and synthetic receptor-embedded lipid membrane assemblies with molecular recognition and signal transduction/amplification functions.' siehe das ganze Dokument ---	1-14
P,X	WO,A,95 16206 (BIOSYSTEMS TECHNOLOGY CORP) 15.Juni 1995 siehe Seite 10, Zeile 18 - Seite 12, Zeile 16; Abbildungen --- -/--	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20.März 1996

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

27.03.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC./AT 95/00197

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,93 10212 (CASE GEORGE D ;WORLEY JENNINGS F III (US)) 27.Mai 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-14
Y	WO,A,94 12875 (AUSTRALIAN MEMBRANE & BIOTECH ;UNIV SYDNEY (AU); KING LIONEL GEORG) 9.Juni 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-14
Y	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, Bd. 9, 1994 Seiten 343-351, XP 000566057 M. ERAY ET AL 'Highly stable bilayer lipid membranes (BLMs) formed on microfabricated polyimide apertures.' siehe das ganze Dokument ---	1-14
A	EP,A,0 441 120 (YEDA RES & DEV) 14.August 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
A	WO,A,89 01159 (COMMW SCIENT IND RES ORG) 9.Februar 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
A	WO,A,90 02327 (AUSTRALIAN MEMBRANE & BIOTECH) 8.März 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1
A	EP,A,0 394 997 (EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG) 31.Oktober 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC./AT 95/00197

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9516206	15-06-95	KEINE	
WO-A-9310212	27-05-93	US-A- 5328847 AU-B- 3177193 EP-A- 0643764	12-07-94 15-06-93 22-03-95
WO-A-9412875	09-06-94	AU-B- 663243 AU-B- 5618894 CA-A- 2150915 EP-A- 0672251	28-09-95 22-06-94 09-06-94 20-09-95
EP-A-0441120	14-08-91	IL-A- 93020 AT-T- 130938 AU-B- 625017 AU-B- 6924591 CA-A- 2033776 DE-D- 69114870 JP-A- 6090736 US-A- 5204239	29-06-95 15-12-95 25-06-92 11-07-91 10-07-91 11-01-96 05-04-94 20-04-93
WO-A-8901159	09-02-89	AT-T- 113724 AU-B- 2127988 CA-A- 1335879 DE-D- 3852036 DE-T- 3852036 EP-A- 0382736 JP-T- 3503209 US-A- 5436170	15-11-94 01-03-89 13-06-95 08-12-94 09-03-95 22-08-90 18-07-91 25-07-95
WO-A-9002327	08-03-90	AU-B- 4078789 CA-A- 1315338 EP-A- 0432188 US-A- 5234566	23-03-90 30-03-93 19-06-91 10-08-93
EP-A-0394997	31-10-90	DE-A- 3913815	08-11-90